

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Sistemas de nanopartículas híbridas para veiculação de DNA

Diana Pereira D'Abreu

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Sistemas de nanopartículas híbridas para veiculação de DNA

Diana Pereira D'Abreu

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Orientador: Professora Doutora Lúcia Maria Diogo Gonçalves

2017

Resumo

Com o simultâneo desenvolvimento dos nanomateriais e da biologia molecular, a interface bionano traz várias aplicações das nanopartículas híbridas para a nanomedicina.

As nanopartículas híbridas não só apresentam propriedades de componentes individuais como também demonstram ter efeitos sinérgicos para aplicações especializadas.

O desenvolvimento de nanopartículas híbridas para marcar células alvo e para diagnósticos e terapêuticas de várias doenças, tem vindo a tornar-se de grande interesse na nanomedicina.

Os nanomateriais podem ser categorizados em diferentes formas, tamanhos e componentes.

Ajustando estes aspetos, podem ser geradas novas propriedades nos nanomateriais para aplicações específicas. A integração de moléculas biológicas com nanomaterial, traz-nos novas prospeções para a nanotecnologia no futuro da medicina.

Nanopartículas com o tamanho e características adequadas, têm vindo a ser produzidas para a veiculação sistémica e intracelular.

Esta pesquisa foca-se no fabrico de novas classes de nanopartículas híbridas que são desenhadas para maximizar a entrega de DNA em células alvo, levando ao aumento da eficácia e redução dos efeitos secundários.

A entrega de ácidos nucleicos, como o DNA, é promissora para o tratamento de diversas doenças, incluindo cancro, por desenvolver um novo mecanismo biológico de ação. Nanopartículas não virais, são uma classe promissora de transportadores de ácido nucleicos, que podem ser desenhados para serem seguros e mais versáteis do que os vetores virais tradicionais.

Neste artigo, são descritos os avanços mais recentes na entrega do DNA focando-se nos métodos de entrega das nanopartículas. As propriedades do material que têm permitido uma entrega com sucesso, são discutidas, tal como as aplicações que têm sido utilizadas na terapia do cancro. Estratégias de co-entrega de diferentes ácidos nucleicos têm se destacado tal como novos alvos, para co-entrega de ácidos nucleicos.

A inovação continuada de novas formas terapêuticas com recurso à nanotecnologia tem como alvos específicos e formas personalizadas de terapia genética no desenvolvimento de medicamentos genéticos para tratamento do cancro.

Palavras-chave: nanotecnologia, DNA, transporte de genes, nanotransportadores, nanopartículas híbridas

Abstract

Together with the simultaneous development of nanomaterials and molecular biology, the bionano interface brings about various applications of hybrid nanoparticles in nanomedicine. The hybrid nanoparticles not only present properties of the individual components but also show synergistic effects for specialized applications.

The development of advanced hybrid nanoparticles for targeted and on demand diagnostics and therapeutics of diseases has rapidly become a research topic in nanomedicine.

Nanomaterials can be categorized into different shapes, sizes, and material components. By tuning of these aspects, new properties of nanomaterials can be generated for specific applications. In particular, the integration of biological molecules with nanomaterial is highly expected to bring about new prospects for nanotechnology in future medicine.

Nanoparticles with a suitable size range have been fabricated for blood circulation and cell uptake.

The research focus is to produce novel classes of programmable hybrid nanoparticles that are precisely engineered to maximize DNA delivery in target cells, leading to enhanced efficacy and reduced secondary effects.

The delivery of nucleic acids such as DNA is promising for the treatment of many diseases, including cancer, by enabling novel biological mechanisms of action. Non-viral nanoparticles are a promising class of nucleic acid carriers that can be designed to be safer and more versatile than traditional viral vectors.

In this review, recent advances in the intracellular delivery of DNA are described with a focus on hybrid nanoparticle-based delivery methods. Material properties that have enabled successful delivery are discussed as well as applications that have directly been applied to cancer therapy. Strategies to co-deliver different nucleic acids are highlighted, as are novel targets for nucleic acid co-delivery.

The continued innovation of new therapeutic modalities and nanotechnologies to provide target-specific and personalized forms of gene therapy hold promise for genetic medicine to treat diseases like cancer in the clinic.

Keywords : nanotechnology, DNA, gene delivery, nanocarriers, hybrid nanoparticles

Índice

1. Introdução.....	7
2. Objetivos.....	9
3. Materiais e Métodos	10
4. Resultados e Discussão	11
4.1. Nanotransportadores de DNA.....	11
4.2. Nanopartículas transportadoras.....	12
4.2.1. Lipossomas e materiais lipídicos	13
4.2.2. Nanopartículas mesoporosas de sílica	14
4.2.3. Nanopartículas mesoporosas de sílica vazias.....	15
4.2.4. Nanopartículas de Fosfato de Cálcio.....	15
4.2.5. Nanopartículas de ouro.....	15
4.2.6. Quantum dots.....	16
4.2.7. Nanopartículas poliméricas	16
4.2.8. Nanopartículas baseadas em ciclodextrina.....	16
4.2.9. Dendrímeros.....	16
4.3. Nanopartículas híbridas.....	17
4.3.1. Modificação das nanopartículas.....	17
4.3.2. Fatores que afetam as nanopartículas híbridas transportadoras.....	18
4.4. Estudos de citotoxicidade e de transfecção	20
4.5. Estudo de conjugação da molécula de DNA.....	21
5. Conclusão.....	23
6. Referências bibliográficas.....	24

Índice de figuras

Fig 1. Comparação de tamanho entre os diferentes tipos de estrutura.....	7
Fig 2. Esquema de co-transporte de DNA e siRNA.....	12
Fig 3. Funcionalização da superfície de NPs de sílica, com diferentes grupos funcionais e (bio)moléculas	17
Fig 4. Esquema representativo da funcionalização da superfície um alcoxi-silano.....	18
Fig 5. Resultados <i>in vitro</i> da citotoxicidade da solução de DTX, DTX/pDNA LPNs e TAT-DTX/pDNA LPNs (a densidade ótica (OD) foi medida a 570 nm, num leitor de microplacas)	20
Fig 6. Eficiência da transfecção <i>in vivo</i> da solução de DTX, DTX/pDNA LPNs e TAT-DTX/pDNA LPNs em ratos modelo com tumores	21
Fig 7. Análise de degradação de 293 células pela entrega de DNA por seis diferentes complexos de nanopartícula/DNA, em mais de 4 semanas.....	22

Índice de tabelas

Tabela 1. Diferentes tipos de sistemas de entrega de fármacos..... 13

Tabela 2. Comparação entre dois sistemas de entrega de fármaco, lipossoma e nanopartícula (+: baixo; ++: moderado; +++: elevado)..... 14

1. Introdução

A nanotecnologia caracteriza-se pela manipulação da matéria a uma escala atômica e molecular.

Ou seja, é a manipulação de objetos à escala nanométrica de forma a criar estruturas que podem levar à formação de novos produtos ou otimização de outros já existentes.

A nanotecnologia ainda está envolvida na síntese, formulação, conceção, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos estruturados, em pelo menos uma dimensão, na escala nanométrica.

Em virtude do seu reduzido tamanho os nanomateriais apresentam propriedades físicas, químicas, mecânicas, elétricas, magnéticas e óticas muito diferentes daquelas que regem o mundo macroscópico. À medida que o tamanho dos sistemas diminui, os fenómenos físicos que regem a matéria alteram-se, uma vez que na escala nanométrica são os efeitos quânticos que dominam. Isto é, com a alteração do seu tamanho, os nanomateriais alteram as suas propriedades como a estabilidade e a reatividade entre outros fatores. Algumas das propriedades que tornam estes materiais interessante deve-se à sua elevada superfície/volume, estrutura bem organizada e definida.

De todas as áreas de aplicação aquela que tem suscitado maior interesse na comunidade científica é a biomedicina. A aplicação da nanotecnologia na medicina surge como um novo campo de pesquisa interdisciplinar entre diversas áreas da ciência, combinando os avanços da medicina com as engenharias. Tem como principal objetivo o fabrico de nanodispositivos e nanomateriais para atuação biológica. É um campo com inúmeras aplicações e potencialidades em diversas áreas no diagnóstico e terapia, desenvolvimento de sistemas inteligentes para entrega e libertação controlada de fármacos, nanocosmética, entre outros. Nos últimos anos a utilização de NPs aumentou de uma forma exponencial tanto na indústria como na investigação.

As NPs são sistemas coloidais definidos como sistemas sólidos à base de polímeros (sintéticos, semissintéticos ou naturais), ou de outros materiais, de natureza biodegradável ou não e que podem servir de veículos para fármacos. Apresentam um tamanho nanométrico, ou seja, se definem como partículas que têm um tamanho compreendido entre 1-100 nm.

De acordo com o processo de síntese, as NPs podem adquirir tamanhos diferentes e morfologias distintas.

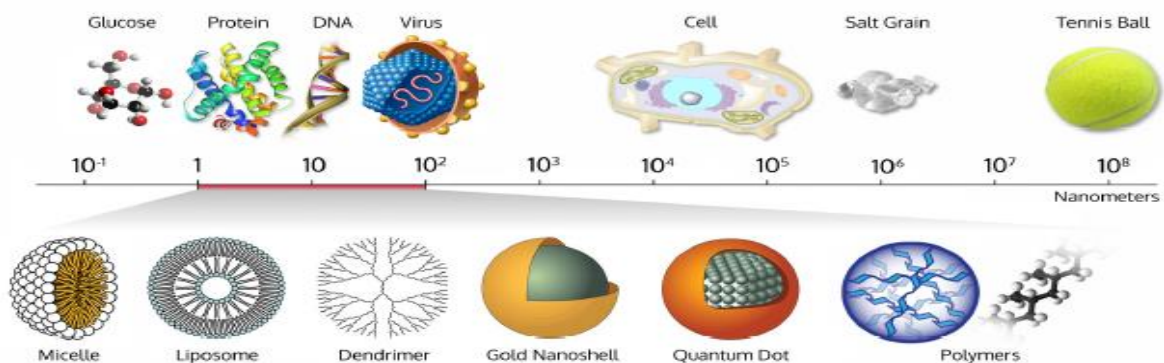


Fig 1. Comparação de tamanho entre os diferentes tipos de estrutura. (adaptada [58])

Apesar dos benefícios que as nanopartículas têm prestado à medicina, algumas aplicações continuam a ser um desafio, como por exemplo, na monitorização em tempo real dos processos celulares, principalmente o local onde se dá a libertação do fármaco. A criação de nanopartículas híbridas pode melhorar significativamente as características das NPs já existentes e superar este tipo de desafio.

A descoberta de que o ácido desoxirribonucleico (DNA) exógeno introduzido num núcleo isolado pode ser transcrito em mRNA, levando à expressão proteica, foi um passo importante para ver a terapia genética como uma modalidade capaz de tratar uma variedade de doenças.

Os primeiros métodos de entrega dos ácidos nucleicos, envolviam processos de ruptura mecânica da membrana celular ou injeção direta. Contudo, estes métodos são de difícil aplicação clínica.

Métodos virais de entrega de DNA são efetivos, mas podem induzir imunogenicidade ou tumorigenicidade, sendo assim limitados quanto à sua tradução clínica. Métodos não virais de entrega de DNA não são tão efetivos, no entanto podem ser desenhados de forma a evitar a tumorigénese e a estimulação imunológica. Os contínuos avanços em vetores de nanopartículas para transporte de ácidos nucleicos, têm vindo a aumentar a eficácia do transporte destes e minimizar a sua toxicidade, todavia existem ainda vários obstáculos que fazem do sucesso do transporte um desafio constante.

Devido ao seu tamanho e à sua carga negativa, os ácidos nucleicos não conseguem passar a membrana celular para os seus locais intracelulares de ação.

Nanopartículas (NPs) transportadoras conseguem encapsular os ácidos nucleicos, não apenas para promover uma entrega bem sucedida às células, como também para proteger estes da sua degradação pelas nucleases extracelulares.

2. Objetivos:

Esta monografia tem como objetivo conhecer os fatores que influenciam o desenho de uma nanopartícula híbrida de forma a esta conseguir contornar as várias barreiras biológicas para a entrega de DNA na célula. Abordando os vários tipos nanopartículas transportadoras que dão origem a nanopartículas híbridas promissoras e o equilíbrio dos fatores que asseguram o bom transporte de DNA pelas mesmas.

3. Materiais e métodos:

Para a realização desta monografia foi realizada o estudo inicial de vários artigos, provenientes de uma pesquisa inicial de conceitos e definições, história e etiologia.

Foram utilizados como motores de busca o *PubMed*(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), o *Google Scholar* (<https://scholar.google.pt/>) e o *Science Direct* (<http://www.sciencedirect.com/>).

Tendo como critério de seleção inicial , artigos com menos de 3 anos, no entanto ao longo do deste estudo foi demonstrado a necessidade de alargar o data dos nossos artigos para conseguirmos perceber as barreiras colocadas neste tema.

Os conceitos utilizados para a pesquisa do conteúdo da monografia foram, “nanotecnologia”, “DNA”, “entrega de genes”, “nanotransportadores” e “nanopartículas híbridas”, fazendo estes parte da construção do nosso tema.

4. Resultados e Discussão:

4.1 Nanotransportadores de DNA

Os nanotransportadores para entrega de ácidos nucleicos incluem lipossomas para restringir o DNA dentro do seu interior aquoso, polímeros catiónicos que ligam os ácidos nucleicos aniônicos para formarem políplexos e nanopartículas sólidas que transportam os ácidos nucleicos via ligações covalentes.

De forma a prevenir interações não específicas entre nanopartículas e biomoléculas e células, as nanopartículas são frequentemente cobertas por polímeros hidrofílicos, como o polietileno glicol (PEG).

Para a entrega intracelular, as células têm que aceitar os ácidos nucleicos transportados pelas nanopartículas. De forma a facilitar a aceitação da célula, péptidos penetradores de células podem ser usados para promover a entrada direta através da membrana da célula. ou nanopartículas catiónica podem interagir não especificamente com a superfície celular carregada negativamente para promover a entrada endossomal dos ácidos nucleicos.

Se entrarem via endossoma, as nanopartículas devem escapar do endossoma para prevenir a sua degradação nos lisossomas, prevenindo também a reciclagem fora da célula e promovendo a entrega citosólica. Isto é possível com biomateriais hidrofóbicos ou anfifílicos que podem destabilizar a membrana endossomal.

A escapatória endossomal pode também ser conseguida usando o mecanismo de esponja protonada, em que o nanomaterial pode atuar como buffer contra a acidificação endossomal, o que resulta numa lise endossomal. Embora este mecanismo tenha vindo a ser desafiado, tem sido a hipótese mais aceite para explicar uma transfecção com sucesso quando se utiliza nanomateriais com aminas tituláveis.

Os nanotransportadores para entrega de DNA podem ter que se manter intactos por mais tempo, devido à difusão lenta do DNA no citosol, podendo este ser degradado, no seu caminho até ao núcleo, por nucleases citosólicas.

Células que ativamente se dividem são mais fáceis de transfectar, tem sido uma hipótese para aumentar a transfecção em células cancerígenas comparando com células não cancerígenas que crescem lentamente.

Nas células não mitóticas, anexar uma sequência peptídica de localização nuclear ao DNA é uma estratégia que aumenta a penetração nuclear. Complexação do DNA dentro de um nanotransportador polimérico tem demonstrado um grande desenvolvimento na associação e permeabilidade nuclear. Para todos estes passos, as propriedades do nanomaterial são a chave para alcançar intracelular nanopartículas DNA base.

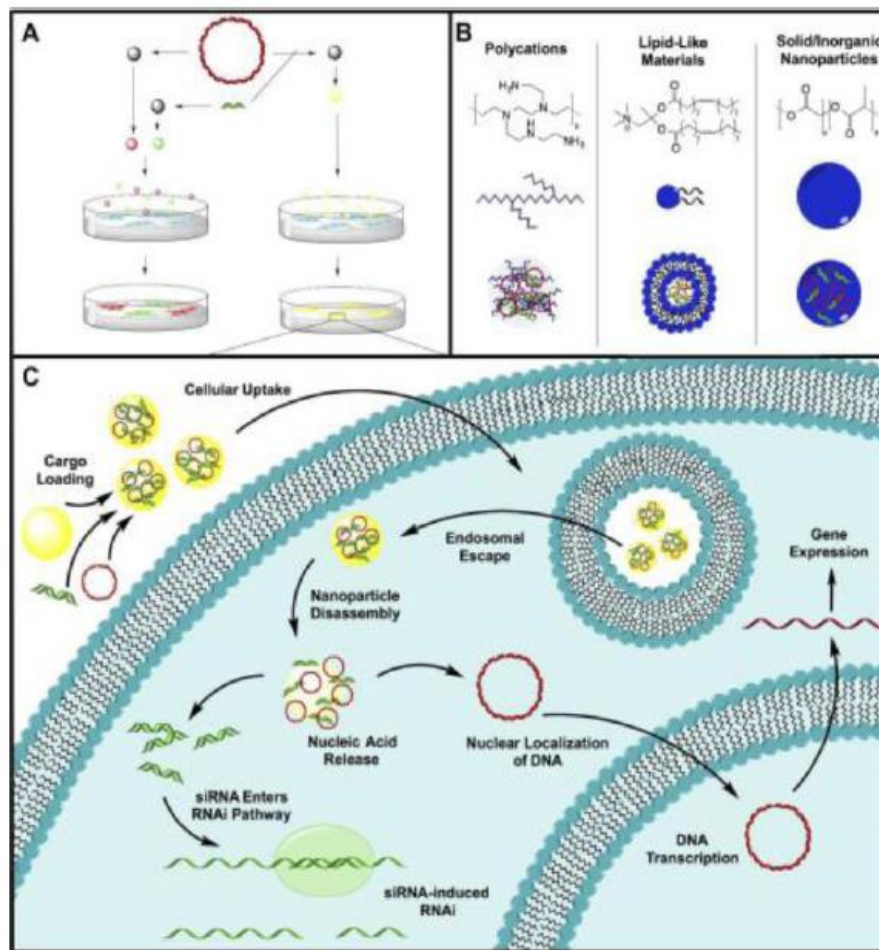






Fig 2. Esquema de co-transporte de DNA e siRNA. (A) Nanopartículas a transportarem DNA e siRNA separadamente com fraca co-entrega, enquanto nanopartículas que transportam os dois ácidos nucleicos, otimizam a coexpressão. (B) Existem diversas classe de nanopartículas não virais para entrega de genes. Cada classe tem a sua estrutura química (cima), nanopartícula específica (centro) e uma método de transporte do ácido nucleico (em baixo). (C) Existem diversas formas de entregar com sucesso DNA e miRNA. (adaptada [59])

4.2. Nanopartículas transportadoras

A composição das NPs determina a compatibilidade e a adaptação para as diferentes aplicações, tais como entrega do fármaco, bioimagem, reconhecimento biomolecular, sensores e revestimentos. Dependendo da composição das nanopartículas, estas podem ser caracterizadas como orgânicas (agregados micelares, dendrímeros, vesículas, nanopartículas poliméricas), inorgânicas (NPs de sílica, ouro, dióxido de titânio, dióxido de ferro, *quantum dots*) e híbridas, com dois ou mais componentes na sua constituição. [19]

Tab 1. Diferentes tipos de sistemas de entrega de fármacos (adaptada de [20])

Sistema de entrega de fármaco	Estrutura	Propriedades / Características
Lipossomas		Forma vesículas com núcleo aquoso Encapsulação de fármaco ocorre no núcleo ou na bicamada lipídica
Dendrímeros		Núcleo bem definido Incorpora biomoléculas através de interações electrostáticas e hidrofóbicas
Nanotubos de carbono		Nanoestrutura cilíndrica Nanotubo de parede única ou múltiplas paredes
Nanopartículas de ouro		Fotosensíveis Utilizadas como núcleo
Nanopartículas de dióxido de titânio		Nanopartículas superparamagnéticas Necessita de estímulo para libertar biomoléculas
Nanopartículas de óxido de ferro		Estrutura nanotubular Terapia fotodinâmica
Nanopartículas de sílica		Estrutura mesoporosa Multifuncionais

4.2.1 Lipossomas e materiais lipídicos

Nanopartículas lipídicas, são o método químico não-viral mais utilizado para o transporte de ácidos nucleicos.

Os lipossomas possuem uma estrutura esférica composta por uma ou várias bicamadas lipídicas e têm a capacidade de se organizar espontaneamente consoante o meio em que se encontram. Isto deve-se ao facto de serem moléculas anfifílicas (cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica). O encapsulamento do fármaco ocorre no interior da dupla camada lipídica ou no núcleo aquoso. [22]

Para o transporte de DNA, a estrutura molecular catiónica do lípido é um fator importante para a eficácia da transfecção, sendo que esta determina a interação do lipossoma com o DNA e com a membrana celular.

Estes lipossomas podem ser modificados, ao serem conjugados, na sua superfície, com ligandos alvo ou adicionando colesterol, otimizando assim a sua capacidade de se ligar à célula e a sua entrada nesta.

Por exemplo, DOTAP nanopartículas, numa vacina de DNA induziu uma resposta imune maior do que o DNA sozinho. Assim, DOTAP pode ser utilizado como adjuvante no transporte de DNA. [21]

Ao comparar uma nanopartícula com um lipossoma, esta possui mais vantagens relativamente ao tamanho, à encapsulação do fármaco, à libertação controlada e ao custo.

Tab 2. Comparação entre dois sistemas de entrega de fármaco, lipossoma e nanopartícula (+: baixo; ++: moderado; +++: elevado) (adaptada [20])

Nanosistema	Tamanho menor	Quantidade de fármaco	Libertação sustentada	Alvo	Estabilidade in vivo	Biocompatibilidade	Baixo custo
Lipossoma	+	+	+	++	+	+++	++
Nanopartícula	++	++	+++	++	++	++	+++

4.2.2. Nanopartículas mesoporosas de sílica (MSNPs)

As dimensões nanométricas das NPs de sílica e a sua elevada razão área superficial, o volume de poros na sua superfície permitem-lhes uma enorme versatilidade e multiplicidade de aplicações, destacando-se a sua utilização como veículos para a libertação controlada de fármacos.

Além disso, estas NPs podem ser modificadas para melhorar a sua eficiência, por exemplo, mediante a funcionalização e conjugação com outras moléculas, dependendo da sua aplicação biomédica: diagnóstico ou terapêutica.

Estas NPs são constituídas por uma matriz de sílica e são caracterizadas pela presença de poros com um diâmetro compreendido entre os 2-50nm. Destacam-se pelo seu reduzido tamanho o que as torna adequadas para trabalhar a nível celular. A sua estrutura rígida e estável permite que sejam submetidas a elevadas temperaturas, mudanças de pH e também ao *stress* mecânico.

As suas propriedades de superfície permitem que estas sejam utilizadas em conjunto com uma elevada gama de componentes, tais como fármacos, proteínas ou sensores. Além disso, as moléculas hospedadas dentro dos poros vão ser protegidas de uma possível degradação em ambientes hostis, como por exemplo o intestino e estômago. Estas propriedades tornam estas NPs interessantes em nanomedicina, em particular em áreas relacionadas com o *drug delivery*. [23,24]

Principais características das MSNPs

- Elevada área superficial ($> 1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) o que permite acumular uma grande quantidade de carga (35%);
- Elevado volume de poro ($> 1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$); grande porosidade;
- Tamanho do poro pode ser modificado e com uma distribuição estreita (2-10nm), permitindo que sejam suscetíveis a serem usadas em *drug delivery* de distintas moléculas;
- Boa estabilidade química e térmica;
- Baixa toxicidade e biocompatibilidade com o organismo humano;
- Duas superfícies funcionalizáveis (interna e externa);
- Mesoestrutura estável;
- Fáceis de modificar morfologicamente (controlo do tamanho, poros e forma)
- Fáceis de sintetizar [25]

4.2.3. Nanopartículas mesoporosas de sílica vazias (HMSNPs)

Semelhantes às nanopartículas mesoporosas de sílica, no entanto para além de conter as mesmas vantagens que estas, tem também a vantagem de o seu núcleo estar vazio, permitindo assim acomodar uma maior quantidade de fármaco. [18]

4.2.4. Nanopartículas de Fosfato de Cálcio

As nanopartículas de fosfato de cálcio (CaP) permitem a entrega de DNA através da sua co precipitação, em cristais à escala nanométrica. Foram sintetizadas nanopartículas com o núcleo em CaP, sendo este com camadas de CaP alternadas com camadas de DNA, prevenindo a degradação deste último e aumentando a eficácia da transfecção.[26]

4.2.5. Nanopartículas de ouro

As NPs metálicas, em especial as NPs de ouro (AuNPs) têm sido alvo de intensa investigação em diversas áreas devido, sobretudo às suas propriedades óticas, catalíticas, eletrónicas, fototérmicas e magnéticas, que lhes conferem uma elevada versatilidade de usos em diversas áreas. Desta forma, a sua aplicação na medicina parece ser das mais promissoras, nomeadamente na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de diferentes patologias como no cancro ou na terapia genética. [29]

À semelhança das MSNs, estas NPs também se podem definir como sistemas transportadores, uma vez que permitem controlar a libertação de fármacos. A libertação dos fármacos, pode ser controlada mediante estímulos internos, como a variação de concentração, ou por estímulos externos como o uso de um laser).

As NPs metálicas apresentam propriedades óticas, eletrónicas e catalíticas diferenciadas dependendo do seu tamanho nanométrico. [28]

Estas NPs apresentam uma baixa toxicidade, elevada estabilidade e biocompatibilidade e uma síntese relativamente simples. Por serem substancialmente inertes em fluidos biológicos tornam-se atrativas para aplicações em nanodiagnóstico. Possuem uma grande área superficial sendo por isso capazes de adsorver biomoléculas sem afetar a sua atividade biológica.

A superfície desta partícula pode ser modificada por grupos catiónicos, como o sal de amónio quaternário, de forma a melhorar a ligação do DNA. [29]

São constituídas por um núcleo metálico, ou seja, estão revestidas por uma camada orgânica a qual é fundamental para modular o tipo de interações com o ambiente circulante. Esta camada determina a sua estabilidade e a reatividade. [27]

A absorção por ressonância plasmónica de superfície (SPR) de NPs metálicas pode ser seguida de uma rápida conversão da luz absorvida em calor. Esta propriedade pode ser utilizada para eliminar células cancerígenas ou para entrega de moléculas dentro das células em um conceito designado por fototermia. Han et al. (2006) utilizou uma ligação ester o-nitrobenzil para controlar a libertação prolongada do DNA, aplicando luz UV. [27]

Assim, as propriedades químicas e físicas dependem de fatores como o tamanho, a composição, a forma, razão área de superfície/volume e a natureza da sua superfície. Deste modo, estas NPs apresentam um enorme potencial de aplicação em áreas tais como nanoimunologia, nanobiotecnologia e na nanomedicina, uma vez que as suas propriedades podem ser facilmente ajustadas na síntese controlando fatores como o tamanho e forma. Além disso, devido à sua escala de tamanho, estas NPs podem ser utilizadas para aplicações em *drug delivery*. [28]

4.2.6. *Quantum dots*

Quantum dots como nanopartículas CdSe/ZnS podem ser usadas como fluoróforos, assim como veículos de DNA. O DNA pode ser conjugado covalentemente com o *quantum dot* de um péptido ou através de uma associação não covalente como polímeros catiónicos que revestem a superfície do *quantum dot*. [30,31]

4.2.7. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas de Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) são vantajosas para diferentes tipos de *drug delivery* devido à sua biodegradabilidade e estabilidade. Pelo que, têm também sido utilizadas em alguns dispositivos médicos aprovados pela FDA.

Nanopartículas de PLGA são sintetizadas por um processo de evaporação emulsão-solvente, e podem conter na superfície, moléculas de modo a facilitar a sua ligação às células e transportar outras moléculas. [32]

O DNA pode ser encapsulado dentro das partículas PLGA, através de um duplo processo de emulsão ou adsorvido pela superfície da partícula, após o seu tratamento com agentes bioaderentes, como por exemplo o carbômero. [33]

Os polímeros mais utilizados na formação das nanopartículas poliméricas transportadoras de genes, são frequentemente catiónicos e interagem, através de energia electrostática, com ácidos nucleicos dando origem a políplexos.

Em estratégias mais antigas era frequentemente utilizada a poli(L-lisina) (PLL) devido à sua natureza catiónica, estas foram modificadas, através da adição de grupos de PEG, prevenindo assim a agregação de partículas no soro. Kim et al.(1998) criou o sistema terplex com partículas estéreis PLL, lipoproteínas de baixa densidade, aumentando tanto a compactação das partículas de DNA, como a ligação deste. [34]

Materiais poliméricos semelhantes tais como poli (amido aminas) (PAAs) e poli (amido etileneiminas) (PAEIs) têm sido desenhados com capacidades tampão do pH endossomal. A degradação dos dendrímeros de PAA é feita através do tratamento de calor, aumenta a flexibilidade do dendrímero, o que leva a uma transfecção mais eficaz. [35]

4.2.8. Nanopartículas baseadas em ciclodextrina

Ciclodextrinas são moléculas solúveis em água, constituídas por 6-9 unidades de glucose que formam uma estrutura com a forma de um cone, em que a parte interior é hidrofóbica e pode complexar com diversas moléculas, incluindo ácidos nucleicos. [37]

As nanopartículas para entrega de DNA podem ser feitas conjugando ciclodextrina com polímeros, incluindo PEI e PAA, que condensam o DNA por interações electrostáticas. O DNA pode também ligar-se covalentemente às ciclodextrinas através de ligações catiónicas. [38]

4.2.9. Dendrímeros

Dendrímeros são estruturas poliméricas que consistem num núcleo molecular central de onde partem diversas cadeias com uma exposição simétrica.

Um dos passos importantes da síntese dos dendrímeros é o controlo do tamanho do polímero, ao mesmo tempo que a estrutura das cadeias resulta numa grande densidade de

grupos nos seus terminais, constituindo uma superfície única, ficando também com uma maior área para se ligar a fármacos ou a outras substâncias.[39] Dois dos dendrímeros que têm sido utilizados para a entrega de um gene são o PAA e a polipropilenimina (PPI). Os dendrímeros deste último com um núcleo de butilenediamina (DAB) têm demonstrado um aumento na ligação com o DNA, levando a uma otimização do balanço entre a ligação dos ácidos nucleicos e a toxicidade. [40]

A arginina tem sido conjugada com os terminais, no intuito de aumentar a permeabilidade da membrana e a localização nuclear. [41]

4.3. Nanopartículas híbridas

As nanopartículas híbridas são preparadas tendo em conta um nível aceitável de tamanho da partícula, a sua capacidade e especificidade de transportar o fármaco e a razão entre os diferentes componentes químicos. As variações dos componentes estruturais das nanopartículas híbridas influenciam as características destas. [48]

4.3.1. Modificação das nanopartículas

A presença de grupos silanol na superfície das nanopartículas permite a sua modificação com grupos funcionais ou (bio)moléculas, tais como moléculas fluorescentes, agentes de acoplamento e biomoléculas, quer por uma ligação covalente ou por adsorção. A presença de grupos reativos (tais como amina, carboxilo ou hidroxilo) na superfície das partículas proporciona locais ativos para ligar outras moléculas. A elevada área de superfície, a versatilidade em ligar-se a grupos funcionais e a biocompatibilidade faz das nanopartículas um dos nanomateriais mais estudados como sistemas de entrega de fármacos. [42]

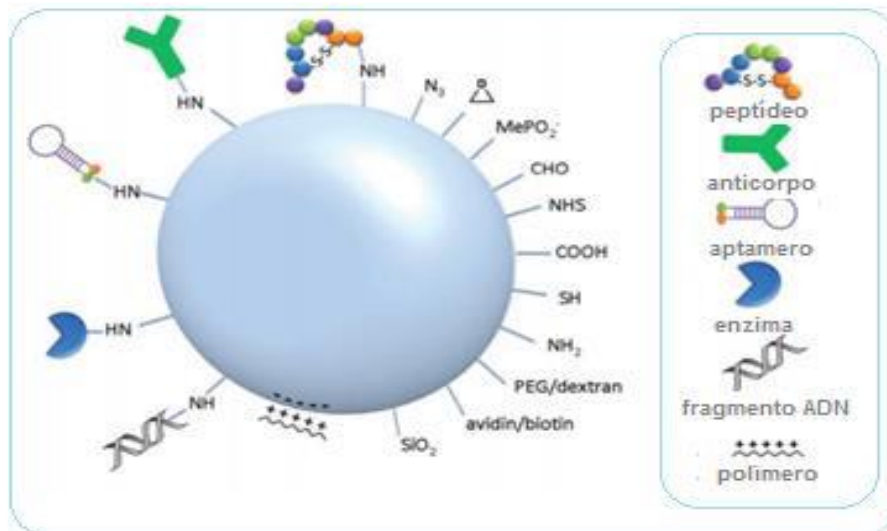


Fig 3. Funcionalização da superfície de NPs de sílica, com diferentes grupos funcionais e (bio)moléculas (adaptada de [42])

A funcionalização das nanopartículas pode ocorrer em diferentes regiões da partícula consoante o objetivo. Na superfície externa destas pode-se imobilizar polímeros ou biomoléculas para possível direcionamento ou deteção. Para funcionalizar as MSNs por exemplo, somente na superfície externa é necessário a presença do tensoativo que permite que os poros fiquem bloqueados e não ocorra funcionalização no interior. Após a

funcionalização o tensoativo poderá ser removido ficando o poro disponível para incorporar diferentes moléculas.

A modificação da superfície tem como finalidade o acoplamento de um agente modificador ou realizar o “enxerto” de uma cadeia polimérica. O agente modificador é constituído por grupos silano e pode ser representado por $\text{RSi}(\text{OR}')_3$, em que o grupo hidrolizável corresponde ao OR' e o grupo R dará a nova funcionalidade à superfície da nanopartícula. [43]

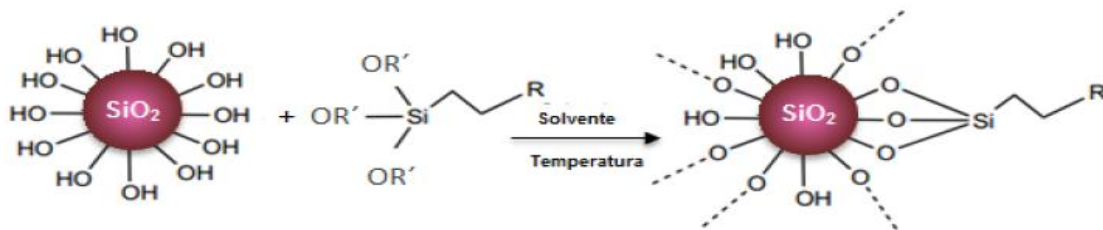


Fig 4. Esquema representativo da funcionalização da superfície um alcoxil-silano.

Os colóides são apresentados como NPs que têm uma gama de tamanho de 1nm e são responsáveis pelo aparecimento da cor e turbidez. Um sistema coloidal pode ser, sólido, líquido ou gasoso.

Os colóides têm um sistema com um estado de energia mais elevada do que os materiais macroscópicos. A estabilidade coloidal é determinada pela energia livre no sistema. O principal parâmetro é a grande área de superfície entre a fase dispersa e a fase contínua. A estabilidade das NPs depende de várias características físicas adquiridas a partir das etapas de crescimento e de nucleação.

4.3.2. Fatores que afetam as nanopartículas híbridas (HNPs) transportadoras

A cobertura lipídica que cobre o núcleo polimérico confere benefícios às nanopartículas híbridas e distinção sobre as nanopartículas não híbridas. A razão entre dois componentes (lípidio-polímero) das partículas híbridas tem um papel importante na estabilidade da formulação, na dispersibilidade e na eficácia da encapsulação. [50]

Quando a razão L/P é baixa, a superfície das nanopartículas não está completamente coberta pelos lípidos, permitindo assim que se formem ligações com a parte lipídica de outras partículas, causando a agregação e a formação de partículas maiores.

Numa concentração lipídica elevada, tem tendência a que o rendimento da reação decresça e a quantidade não incorporada nas partículas e os lípidos livres se reorganizem e formem lipossomas, podendo estes afetar a homogeneidade da formulação.

A concentração dos lípidos deve ser otimizada, de forma a que estes cubram o núcleo polimérico, tendo como base o tamanho da partícula e o rendimento da reação.

Num estudo, Chew et al.(2011). Preparou HNPs com PC (fosfatidilcolina) e PLGA para transportar antibióticos, com W_{PC}/W_{PLGA} com valor $< 15\%$ e dos 90%. Com um valor lipídico abaixo dos 15%, formaram-se partículas maiores (800-1000nm) e a uma concentração ótima, houve um grande decréscimo no tamanho destas.

A razão lipídica acima de uma concentração ótima, por exemplo, 30% não reduziu o tamanho da partícula, mas reduziu o rendimento, assim como todos os lípidos estudados. [49]

Um valor ótimo da razão entre lípido e polímero também confere estabilidade coloidal às HNPs, levando a uma densidade ótima de carga na superfície, que é responsável pelas forças electroestáticas repulsivas que previnem a coalescência e estabilizam a formulação. No caso da parte lipídica ser insuficiente e as forças electroestáticas repulsivas serem fracas, alguns componentes como PEG, podem ser incorporados na formulação, de forma a criarem repulsões estéreis e estabilizarem as HNPs.[52]

A carga da parte lipídica que é responsável pelas repulsões electroestáticas entre as partículas, é protegida quando existe uma mistura de lípidos catiónicos e zwitteriônicos.

As cabeças aniônicas dos lípidos zwitteriônicos ficam viradas para fora, o que reduz a carga dos lípidos catiónicos, promovendo assim a agregação de partículas. O lípido zwitteriônico DPPC dá origem a uma agregação menor que o lípido catiónico DOTAP, por isso um íon zwitter lipídico dá uma maior estabilidade do que outros íões lipídicos.[53]

Os dois benefícios que o aumento lipídico confere às HNPs são a eficácia da encapsulação e a libertação prolongada do fármaco. O primeiro é conseguido, evitando a perda durante o processo de formação; o segundo é devido à reduzida interação dos lípidos com a dissolução do meio, adiando a penetração da água.

A carga da superfície dos lípidos e dos fármacos também afeta a eficácia da encapsulação, devido à interação entre a carga da superfície da HNP e do fármaco. [51,53]

Para que a estabilidade dos sistemas HNP suporte soluções salinas, ações tampão e absorção pelos macrófagos é modificada a sua superfície com PEG, dando-se a peguilação. PEGs pode aumentar em escala o tempo de circulação das HNPs, prevenindo a agregação, a opozinação e a adsorção das proteínas plasmáticas.

A incorporação do PEG-lípido afeta a estabilidade coloidal das HNPs de duas maneiras, através do comprimento da cadeia PEG-lípido e da razão molar do PEG-lípido. [51]

HNPs cobertas por longas cadeias de PEG-lípido exibem uma estabilidade maior do que cobertas com cadeias curtas. O mesmo acontece, quando são incorporados mais PEG-lípidos no núcleo polimérico, todos com o mesmo tamanho, e a espessura da camada lipídica aumenta, diminuindo assim o potencial zeta e aumentando a sua estabilidade. [51,52]

As características como a densidade e a carga superficial, têm um papel importante na produção das HNPs.

HNPs produzidas com elevada densidade polimérica, são menos estáveis no que diz respeito às forças iónicas do meio, devido a uma elevada sedimentação que acontece quando as cargas electroestáticas são protegidas.

A PLA é 1.18 vezes mais densa do que o poliestireno; consequentemente, HNPs preparadas com um núcleo de PLA tem uma menor estabilidade coloidal, devido à força iónica do meio ser crescente. [54]

Zhang et al.(2008) avaliou a mudança da viscosidade do polímero PLGA de 0.19 para 0.82 o que resultou na diminuição do diâmetro da partícula de 92.7 nm para 66.7 nm. [55]

A adsorção de lípidos sobre as partículas poliméricas para formar a camada lipídica, depende da curvatura e da carga superficial da partícula.

Os lípidos catiónicos exibem uma maior adsorção do que os zwitteriões em relação ao núcleo polimérico aniónico. Devido a atrações electroestáticas sobre o núcleo polimérico, da parte do polímero aniónico PLA, tem uma maior afinidade com lípidos catiónicos DPTAP do que com DPPC zwitteriónico.

O rearranjo lípido à volta do núcleo polimérico pode ser rápido e completo se a afinidade entre lípido e polímero for elevada. Uma maior distribuição e estruturas lipídicas livres são observadas, quando os lípidos não se conseguem rearranjar à volta do núcleo polimérico, pela sua fraca afinidade.

A modificação do valor do pH do meio pode melhorar a afinidade do polímero para com o lípido, fazendo variar também a carga da superfície. [54,56,57]

4.4. Estudo de citotoxicidade e de transfecção

Péptidos penetradores de células (CPPs), tal como os lípidos, têm recebido uma grande atenção como eficiente vetor de entrega celular, por causa da sua intrínseca habilidade de entrar nas células e mediar a entrada de algumas cargas, como pDNA, fármacos, nanopartículas, etc. [44]

Shufanf et al.(2016) formou diversos complexos com TAT, PEG-PEI, ácido oleico, LPNs, pDNA e DOX, e estudou a sua citotoxicidade e a eficiência da transfecção contra linhas de células do cancro das próstata *in vitro* e *in vivo*.

Referente aos dados de citotoxicidade TAT-DTX/pDNA LPNs inibiu a viabilidade e a proliferação da linha de células cancerígenas em baixas concentrações, com um valor de IC₅₀ muito mais baixo que qualquer outra formula testada, o que prova ter maior habilidade de inibição das células tumoríferas.[11] Uma maior toxicidade de TAT-DTX/pDNA LPNs comparativamente com DTX/pDNA LPNs, pode evidenciar a habilidade do TAT em marcar células cancerígenas, aumentando assim a eficácia dos fármacos anticancerígenos.[46]

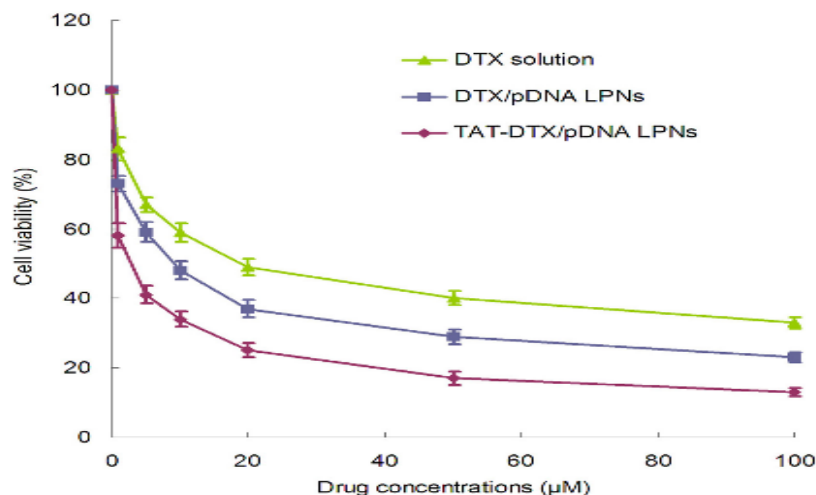


Fig 5. Resultados *in vitro* da citotoxicidade da solução de DTX, DTX/pDNA LPNs e TAT-DTX/pDNA LPNs (a densidade ótica (OD) foi medida a 570 nm, num leitor de microplacas) (adaptado [11])

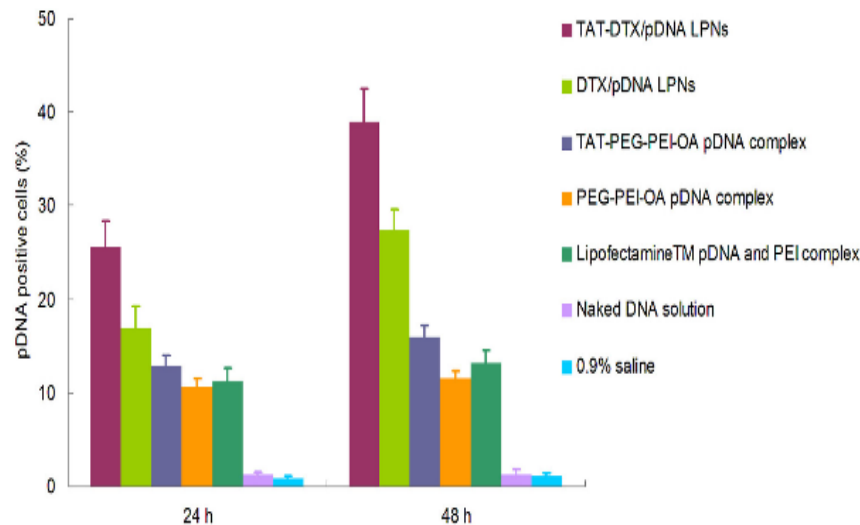


Fig 6. Eficiência da transfecção *in vivo* da solução de DTX, DTX/pDNA LPNs e TAT-DTX/pDNA LPNs em ratos modelo com tumores (as células foram incubadas por mais 24h, depois do meio ter sido substituído por um meio completamente novo. (A eficiência da transfecção foi quantitativamente avaliada usando a citometria de fluxo)

Foi observada uma maior transfecção no gráfico do grupo TAT-DTX/pDNA LPN tanto nas 24h como nas 48h após a administração, estes resultados podem ser explicados pela camada lipídica da LPNs e a sua grande afinidade à estrutura lipídica da superfície da célula, a carga catiónica superficial pode absorver a carga negativa da superfície da célula, promovendo a fusão dos nanotransportadores com a membrana da célula e entregar mais gene às células tumoríferas. A estrutura de LPNs pode adiar a libertação do fármaco/gene mais do que outros vetores, resultando no efeito de entrada mais longo e duradouro do fármaco/gene nas células tumorais. [47]

4.5. Estudo de conjugação da molécula de DNA

Zhong et al. (2010) fez um estudo de otimização de entrega de DNA por três classes de complexos nanopartículas híbridas (HNPs)/DNA, em que o gene foi complexado com seis diferentes nanopartículas híbridas, sintetizadas através de misturas PLGA e lípidos catiónicos DOTAP ou DC-Chol. As partículas apresentavam um tamanho 100-400nm de diâmetro e o resultado dos complexos tinha DNA adsorvido na superfície (out), encapsulado (in) ou DNA adsorvido e encapsulado (both). Foi estudada a expressão destes seis complexos em 293 células.

A aceitação de DNA pelos complexos NP/DNA foi 500-600 vezes mais eficiente que DNA livre.

NPs com DNA ligado externamente (out) tiveram uma descida abrupta nas linhas de análise de regressão, enquanto nanopartículas DNA encapsulado e adsorvido (both) exibiram um tempo de retenção maior.

Sendo potencialmente utilizado as HNPs com DNA adsorvido (out) como “priming” em estudos de imunização animal, enquanto HNPs com DNA adsorvido e encapsulado (both) são ótimas para fortalecer o sistema imunitário.[10]

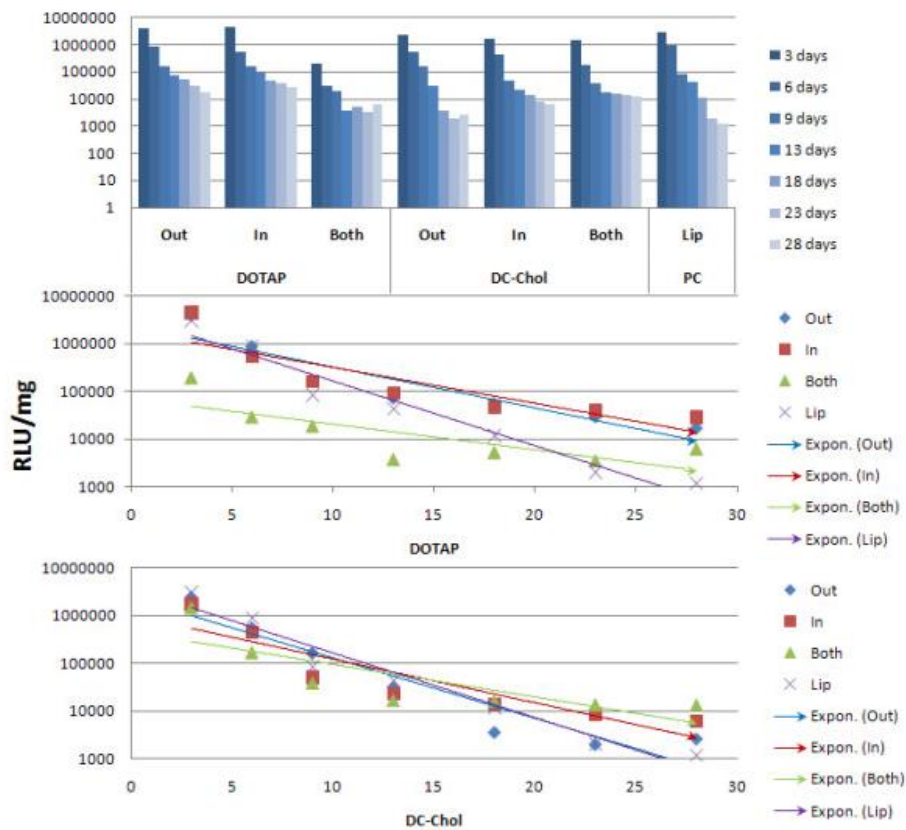


Fig 7. Análise de degradação de 293 células pela entrega de DNA por seis diferentes complexos de nanopartícula/DNA, em mais de 4 semanas.

Foram usadas duas misturas lipídicas (PLGA/DOTAP e PLGA/DC-Chol) e três classes de complexos NP/DNA (out, in and both). Lip (mistura Lip2000/DNA) foi utilizado como controlo positivo. As colunas acima mostram a atividade da luciferase em intervalos de 3 ou 4 dias, durante 4 semanas. O gráfico do meio corresponde a nanopartículas DOTAP e o de baixo a nanopartículas DC-Chol. A análise regressiva deu linhas rectas (azul para out, vermelha para in e verde para both) para as nanopartículas e Lip (roxa). (adaptada [10])

5. Conclusão:

A nanotecnologia tem um forte impacto na área da saúde. O seu avanço, em conjunto com a capacidade de manipular e controlar a matéria a uma menor escala e o aproveitamento das propriedades novas dos nanomateriais, apresenta uma nova forma de encarar a doença. Deste modo, a nanomedicina começou a ganhar um espaço na sociedade, académica e clínica devido ao seu grande espectro de aplicações, algumas das quais já se encontram no mercado (anexo I). Na atualidade, a nanotecnologia tem potencial para introduzir melhorias na deteção precoce e no diagnóstico, e para o tratamento de diversas patologias crónicas e agudas, favorecendo a rapidez, a sensibilidade e especificidade de análise.

As tecnologias de nanopartículas para entrega de DNA têm evoluído rapidamente, com muito biomaterial complementar e desenhos de novas partículas. Várias plataformas de entrega promissoras que envolvem uma base lipídica, inorgânica e nanotransportadores poliméricos têm vindo a ser desenvolvidos com forte eficácia in vivo, alguns entraram mesmo em ensaios clínicos (anexo I). O interesse nestas tecnologias deve-se ao seu grande potencial para a entrega de material genético, para tratar doenças causadas por expressões genéticas aberrantes, como o cancro, e a necessidade de obter métodos seguros e efetivos de entrega. A investigação continuada na inovação da nanotecnologia, nomeadamente sobre como ultrapassar as diferentes barreiras para a entrega intracelular podem melhorar a abordagem no tratamento de doenças genéticas como o cancro.

No futuro, será necessário ter em conta que a nanotecnologia se encontra em crescente desenvolvimento e que requer mais investigação, não só a nível das suas potencialidades de diagnóstico e de terapêuticas, mas também ao nível da toxicidade e efeitos secundários dos novos nanomateriais no organismo. Ou seja, será necessário compreender melhor as interações e as reações das NPs no organismo. O transporte das NPs ao nível da circulação e a forma como são excretadas também necessitam maior compreensão e estudo.

6. Referências bibliográficas :

- 1 A. Babu, A. K. Templeton, A. Munshi, R. Ramesh, "Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer:Progress and Challenges" *Journal of Nanomaterials*, 2013, 11, DOI: 10.1155/2013/863951.
- 2 S. A. Mousa, D. J. Bharali, "Nanotechnology-Based Detection and Targeted Therapy in Cancer: Nano-Bio Paradigms and Applications", *Cancers* 2011, 3, 2888-2903, DOI: 10.3390/cancers3032888.
- 3 A. Rodrigues, T. Ribeiro, F. Fernandes, J. P. Farinha, C. Baleizão, "Intrinsically Fluorescent Silica Nanocontainers: a promising theranostic platform", *Microscopy and Microanalysis*, 2013, 19, 1216-1221, DOI: 10.1017/S1431927613001517.
- 4 E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. G. Palivan, W. Meier "Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine", *Biointerphases*, 2012, 7:9 DOI: 10.1007/s13758-011-0009-3
- 5 Y. Zhang, M. Yang, N. G. Portney, "Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells", *Biomedical Microdevices*, 2008, 10, 321–328, DOI 10.1007/s10544-007-9139-2.
- 6 C.Weibo, T. Gao, H. Hong, and J. Sun "Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology." *Nanotechnology, Science and Applications* 2008 : 17–32. doi:10.2147/NSA.S3788.
7. C. Guozhong. "Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties and Applications." *Imperial College Press* 2004. doi:10.1142/9781860945960.
8. S. Rajiv, S. Saini, and S. Sharma. "Nanotechnology: The Future Medicine." *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 2010: 32–33. doi:10.4103/0974-2077.63301.
9. E. Farris, D. Brown, A. Ramer-Tait, A. Pannier "Chitosan-zein nano-in-microparticles capable of mediating in vivo transgene expression following oral delivery" *Corel* 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.035
10. Q. Zhong, D. Chinta, S.Pamujula, H. Wang, X. Yao, T. Mandal, R. b. Luftig "Optimization of DNA delivery by three classes of hybrid nanoparticle/DNA complexes" *Journal of Nanobiotechnology* 2010
11. S.Dong, X. Zhou, J. Yang "TAT modified and lipid – PEI hybrid nanoparticles for co-delivery of docetaxel and pDna" *Biomedicine & Pharmacoterapy* 84 2016, 954-961

12. M.Girard, J. Millan, M. de la Cruz "DNA-Driven Assembly: From Polyhedral Nanoparticles to Proteins" *Annual Review of Materials Research* 2017. 47:9.1-9.17

13. M. Karimi, P. Sahandi Zangabad, F. Mahidizadeh, H. Malekzad, A. Ghasemi, S. Bahrami, H. Zare, M. Moghoofei, A. Hekmatmanesh and M.R. Hamblin, "Nanocaged Platforms: Modification, Drug Delivery and Nanotoxicity Opening Synthetic Cages to Release de Tiger" *Nanoscale* 2016, DOI: 10.1039/C6NR07315H

14. A. Akbarzadeh, L. Kafshdooz, Z. Razban, A. Tbrizi, S. Rasoulpour, R. Khalilov, Taras Kavetsky, S. Saghfi, Aygun N. Nasibova, S. Kaamyabi, T. Kafshdooz "An overview application of silver nanoparticles in inhibition of herpes simplex virus" *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2017 DOI: 10.1080/21691401.2017.1307208

15. C.Shao, J. Liang, S. He, T. Luan, J. Yu, H. Zhao, J. Xu "pH-Responsive Graphene Oxide-DNA Nanosystem for Living Cell Imaging and Detection" *Analytical Chemistry* 2017

16. J. C. Leach, A. Wang, K. Ye and S. Jin " A RNA-DNA Hybrid Aptamer for Nanoparticle-Based Prostate Tumor Targeted Drug Delivery" *Department of Biomedical Engineering, University Arkansas* 2016

17. C. Zhao, L. Shao, J. Lu, X. Deng, Y. Tong and Y. Wu " Hybrid Prodrug Nanoparticles with Tumor Penetration and Programmed Drug Activation for Enhanced Chemoresistant Cancer Therapy" *Applied Materials Interfaces* 2017 Doi: 10.1021

18. K. Nguyen, Y. Zhao "Engineered Hybrid Nanoparticles for On- Demand Diagnostics and Therapeutics" *Accounts of Chemical research* DOI: 10.1021%acs.accounts.5b00316

19. N. Sanvicens, MP. Marco, "Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine", *Trends in Biotechnology*, 2008, 26, 425-433, DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.04.005

20. S. Kwon, R. K Singh, R. A Perez, E. A. A. Neel, H. Kim, W. Chrzanowski, "Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery", *Journal of Tissue Engineering*, 2013, DOI: 10.1177/2041731413503357

21. J.Heyes , L.Palmer , K.Bremner, et al. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *Journal of Controlled Release*. 2005; 107:276–87. [PubMed: 16054724]

22. H.Zou; S.Wu.; J.Shen; "Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, Characterization, Properties, and Applications", *Chemical Reviews*, 2008, 108, 3893-3957., DOI: 10.1177/2041731413503357.

23. D. Cornejo-Monroy, J. F. Sánchez-Ramírez*, J. A. Pescador Rojas, J. L. Herrera-Pérez. "Nanoesferas Monodispersas de SiO₂: Síntesis Controlada Y Caracterización." *Superficies Y Vacío*. 2009

24. De Barros, A. L. Branco, K. Ferraz, T. Dantas, G. Andrade, V. Cardoso, and E. Sousa. "Synthesis, Characterization, and Biodistribution Studies of 99mTc-Labeled SBA-16 Mesoporous Silica Nanoparticles." *Materials Science and Engineering: C* 56 (August): 181–88. doi:10.1016/j.msec.2015.06.030.

25. Wang, Ying, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, et al. 2015a. "Mesoporous Silica Nanoparticles in Drug Delivery and Biomedical Applications." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11 (2). Elsevier Inc.: 313–27. doi:10.1016/j.nano.2014.09.014.

26. M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, et al. "PEGylated Calcium Phosphate Nanocomposites as Smart Environment-Sensitive Carriers for siRNA Delivery". *Advanced Materials*. 2009; 21:3520–5.

27. G.Han,CC. You,Bj Kim, et al. "Light-Regulated Release of DNA and Its Delivery to Nuclei by Means of Photolabile Gold Nanoparticles". *Angewandte Chemie*. 2006; 118:3237–41.

28. Santos, J M, S M Rodrigues, D M Ribeiro, and J V Prior. 2014. "Perspetivas de Utilização de Nanomateriais Em Nanodiagnóstico Prospectives for the Use of Nanomaterials in Nanodiagnostic"
3: 2–12.

29. NL.Rosi, DA Giljohann, CS Thaxton, et al. "Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science*". 2006; 312:1027–30. [PubMed: 16709779]

30. X Wu ,X Liu,J Liu, et al."Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots". *Nature Biotechnology*. 2002; 21:41–6.

31. C Srinivasan, J Lee,F Papadimitrakopoulos, et al. "Labeling and Intracellular Tracking of Functionally Active Plasmid DNA with Semiconductor Quantum Dots". *Mol Ther*. 2006; 14:192– 201. [PubMed: 16698322]

32. J Zhou, TR Patel,M Fu, et al. "Octa-functional PLGA nanoparticles for targeted and efficient siRNA delivery to tumors". *Biomaterials*. 2012; 33:583–91. [PubMed: 22014944]

33. JS Kim, BI Kim, A Maruyama, et al. "A new non-viral DNA delivery vector: the terplex system". *Journal of Controlled Release*. 1998; 53:175–82. [PubMed: 9741925]
34. ML Patil, M Zhang, T Minko . " Multifunctional Triblock Nanocarrier (PAMAM-PEG-PLL) for the Efficient Intracellular siRNA Delivery and Gene Silencing". *ACS Nano*. 2011; 5:1877–87. [PubMed: 21322531]
35. O Boussif, F Lezoualc'h , MA Zanta , et al. "A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo: Polyethylenimine". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92:7297–301.. [PubMed: 7638184]
36. WT Godbey , KK Wu, AG Mikos. "Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 96:5177– 81.
37. S Li, WC Purdy. "Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry". *Chemical Reviews*. 1992; 92:1457–70.
38. V Burckbuchler, V Wintgens, C Leborgne, et al. "Development and Characterization of New Cyclodextrin Polymer-Based DNA Delivery Systems". *Bioconjugate Chemistry*. 2008; 19:2311– 20. [PubMed: 19053313]
39. C Dufès, IF Uchegbu, AG Schätzlein. "Dendrimers in gene delivery". *Adv Drug Deliver Rev*. 2005; 57:2177–202.
40. BH Zinselmeyer, SP Mackay, AG Schatzlein, et al. "The Lower-Generation Polypropylenimine Dendrimers Are Effective Gene-Transfer Agents". *Pharmaceutical Research*. 19:960–7. [PubMed: 12180548]
41. T-I Kim, J-u Baek, Zhe Bai., et al. "Arginine-conjugated polypropylenimine dendrimer as a non-toxic and efficient gene delivery carrier". *Biomaterials*. 2007; 28:2061–7. [PubMed: 17196650]
42. A. Schulza, C. McDonagh, "Intracellular sensing and cell diagnostics using fluorescent silica nanoparticles", *Soft Matter*. 2012, 8, 2579-2585, DOI: 10.1039/C2SM06862A.
43. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, V. S. Lin." Mesoporous silica nanoparticles: Structural design and applications", *Journal of Material Chemistry*, 2010, 20, 7924–7937, DOI: 10.1039/c0jm00554a.

44. S.M. Farkhani, A. Valizadeh, H. Karami, S. Mohammadi, N. Sohrabi, F. Badrzadeh, "Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules", *Peptides* 57, 2014, 78-94.
45. J.S. Suk, J. Suh, K. Choy, S. K. Lai, J. Fu, J. Hanes, "Gene delivery to differentiated neurotypic cells with RGD and HIV Tat peptide functionalized polymeric nanoparticles", *Biomaterials* 27, 2006 5143-5150
46. C. Yan, J. Gu, D. Hou, H. Jing, J. Wang, Y. Guo, H. Katsumi, T. Sakane, A. Yamamoto, "Improved tumor targetability of TAT- conjugated PAMAM dendrimers as a novel nanosized anti-tumor drug carrier", *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41 , 2015
47. S. Krishnamurthy, R. Vaiyapuri, L. Zhang, J. M. Chang, "Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery", *Biomater. Sci.* 3, 2015 923-936
48. SK Messerschmidt, A Musyanovych, M Altvater, P Scheurich, K Pfizenmaier, K Landfester, et al. "Targeted lipid-coated nanoparticles: delivery of tumor necrosis factor-functionalized particles to tumor cells". *Journal of Controlled Release*. 2009;137(1):69–77. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.03.010.
49. WS Chew, K Hadinoto. "Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid–polymer hybrid nanoparticles". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;85(2):214–220. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.02.033.
50. M Varthya, H Pawar, C Singh, CP Dora, SK Jena, S Suresh. "Development of novel polymer-lipid hybrid nanoparticles of tamoxifen: in vitro and in vivo evaluation". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;16(1):253–260. DOI: 10.1166/jnn.2016.10651.
51. JM Chan, L Zhang, KP Yuet, G Liao, J-W Rhee, R Langer, et al. "PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery". *Biomaterials*. 2009;30(8):1627–1634. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.013.
52. A-L Troutier, T Delair, C Pichot, C Ladavière. "Physicochemical and interfacial investigation of lipid/polymer particle assemblies". *Langmuir*. 2005;21(4):1305–1313. DOI: 10.1021/la047659t.

53. B Mandal, H Bhattacharjee, N Mittal, H Sah, P Balabathula, LA Thoma, et al. "Core-shelltype lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013;9(4):474–491. DOI:10.1016/j.nano.2012.11.010.
54. J Thevenot, A-L Troutier, J-L Putaux, T Delair, C Ladaviere. "Effect of the polymer nature on the structural organization of lipid/polymer particle assemblies". *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008;112(44):13812–13822. DOI: 10.1021/jp805865r.
55. L Zhang, JM Chan, FX Gu, J-M Rhee, Wang, AF Radovic-Moreno, et al. "Selfassembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform". *ACS Nano*. 2008;2(8):1696–1702. DOI: 10.1021/nn800275r.
56. S Mornet, O Lambert, E Duguet, A Brisson. "The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy". *Nano Letters*. 2005;5(2): 281–285. DOI: 10.1021/nl048153y.
57. J Schmitt, B Danner, TM Bayerl. "Polymer cushions in supported phospholipid bilayers reduce significantly the frictional drag between bilayer and solid surface". *Langmuir*. 2001;17(1):244–246. DOI: 10.1021/la001275v.
58. Wich, R Peter. 2015. "Baukasten Der Natur." *Nachrichten Aus Der Chemie* 63: 128–32. doi:10.1002/nadc.201590046.
59. K. L. Kozielskia,, Y. Ruia,, and J. J. Green; "Non-viral nucleic acid containing nanoparticles as cancer therapeutics" *Expert Opin Drug Deliv*. 2016; 13(10): 1475–1487. doi:10.1080/17425247.2016.1190707.

Anexo I

Drug product	Active ingredient	Manufacturer	Indications	FDA approved date/clinical trial status
Doxil (Caelyx)	Pegylated doxorubicin	Orthobiotech, Schering-Plough	Ovarian/breast cancer	November 1995
Abraxane	Albumin-bound Paclitaxel nanospheres. Nab paclitaxel in combination with gemcitabine	Abraxis Bioscience, Astra Zenica Celgene	Various cancers Metastatic pancreatic cancer	Jan-05 September 2013
Myocet	Liposome-encapsulated Doxorubicin	Elan/Sopherion therapeutics	Breast cancer	2000, Approved in Europe and Canada
DaunoXome	Liposome-encapsulated Daunorubicin	Gilead Science	HIV-related Kaposi sarcoma	Apr-96
DepoCyt	Liposomal Cytarabine	Skye Pharma, Enzon	Lymphomatous meningitis	Apr-99
Oncaspar	PEGasparaginase	Enzon	Acute Lymphocytic Leukemia	Feb-94
Onco-TCS	Liposomal Vincristine	Inex	Non-Hodgkin Lymphoma	In clinical phase I/II
LEP-ETU	Liposomal Paclitaxel	Neopharma	Ovarian/breast/lung cancers	In clinical phase I/II
Aroplatin	Liposomal Cisplatin analog	Antigenics Inc.,	Colorectal cancer	In clinical phase I/II
OSI-211	Liposomal Lurtotecan	OSI	Lung cancer/recurrent ovarian	In clinical phase II
SPI-77	Stealth liposomal Cisplatin	Alza	Head & Neck cancer/Lung cancer	In clinical Phase III
EndoTAG-I	Paclitaxel	Medigene/SynCore Biotechnology	Breast cancer/Pancreatic	In clinical phase II

			cancer	
Marqibo	Vincristine	Talon Therapeutics	Philadelphia chromosome-negative lymphoblastic leukemia	Aug-12
Thermodox	Doxorubicin	Celsion	Hepatocellular carcinoma	In clinical phase III
Atragen	Liposomal all trans-retinoic acid	Aronex Pharmaceuticals	Acute promyelocytic leukemia	In clinical phase II
Lipoplatin	Liposomal Cisplatin	Regulon	Pancreatic/ Head and Neck/breast cancer	In clinical phase III
Aurimmune (CYT-6091)	TNF- α bound to colloidal Gold nanoparticles	Cytimmune Sciences	Head and Neck cancer	In clinical phase II
Auroshell	Gold nanoshells	Nanospectra Biosciences	Aurolace therapy of cancer	In clinical Phase 1
Genexal-PM	Paclitaxel-loaded polymeric micelle	Samyang	Breast cancer/small cell lung cancer	Marketed in Europe, Korea
Paclical	Paclitaxel micelles	Oasmia Pharmaceutical AB	Ovarian cancer	Phase III
Nektar -102	Irinotecan, PEGylated liposome	Nektar therapeutics	Breast /colorectal cancer	In clinical Phase 3
NKTR-105	PEG-Docetaxel	Nektar therapeutics	Solid tumors	Phase 1
Ontak	Diphtheria toxin and	Seragen, Inc	Cutaneous T-cell	1999